



miRNA 第一链 cDNA 合成试剂盒(加尾法)

miRNA First-Strand cDNA Synthesis Kit (by tailling A)

Cat.NO.: ZR109

试剂盒组成	ZR109-1 25T	ZR109-2 50T
miRNA RT Enzyme Mix	50μl	100μl
2×miRNA RT Buffer	250μl	500μl
Universal Reverse Primer(10 uM)	250μl	500μl
RNase-free ddH ₂ O	1ml	1ml×2

保存和运输条件:

干冰运输: 短距离可以凝胶冰运输。 收到本产品后, 请立即置于-30℃~-15℃保存, 避免反复冻融。

产品简介:

本产品以总RNA或miRNA为模板, 先通过Poly(A)聚合酶在miRNA的3'端加多聚A尾, 随后使用Universal Oligo(dT) Primer进行逆转录反应, 最终生成miRNA对应的cDNA第一链。

本产品中, miRNA RT Enzyme Mix包含了E. coli Poly(A) Polymerase和逆转录酶, 其中的E. coli Poly(A) Polymerase特异性识别单链miRNA, 降低了miRNA前体的逆转录; 逆转录酶经过分子改造, 无RNase H活性, 增加了RNA模板亲和力, 从而使得miRNA的逆转录反应具有更高的效率和灵敏度。

2×miRNA RT Buffer包含了miRNA加A尾反应和逆转录反应的所有组分, 在一管中即可同时完成加A尾和逆转录。

适用范围:

以总RNA或miRNA为模板, 进行加A尾法逆转录, 产物用于RT-PCR、荧光定量PCR。

注意事项:

冻存的反转录试剂应完全融解后混匀均一, 冰上备用; 反转录体系的配制建议在冰上完成, 并严格按照RNA实验操作注意事项, 以预防RNase污染。

实验流程

1、配制反转录体系

Components	Volume
2×miRNA RT Buffer	10 μ l
miRNA RT Enzyme Mix	2 μ l
Total RNA/miRNA	100 ng-2 μ g
RNase-free ddH ₂ O	Add to 20 μ l

注：使用的Total RNA模板必须含有miRNA。根据目的miRNA丰度决定加入量，低丰度的miRNA样本可直接加入最大体积8 μ l。

2、反转录程序

移液器轻轻吹打混匀反应液，离心后按照以下表中程序进行第一链cDNA合成。

温度	时间
37℃	60 min
85℃	5 min

注：合成的cDNA应避免反复冻融，长期保存建议存放-70℃，也可直接用于荧光定量实验；为避免逆转录体系对PCR反应的抑制，根据具体的CT值，建议稀释10-1000倍使用。

荧光定量PCR引物设计：

1. Forward Primer引物设计原则

- 以成熟的miRNA序列为基础，将U替换成T。
- 试剂盒提供的下游引物T_m值为60℃，设计引物时尽量保证在60℃左右。
- 若根据以上原则设计的引物T_m值过低，建议在引物5'端添加几个碱基（以G和C为主），添加碱基后应验证引物特异性，并避免二级结构
- 若设计的引物T_m值过高，建议在引物5'端或3'端删去几个碱基。

2. Reverse Primer引物

本产品提供反向通用引物Universal Reverse Primer，T_m值为60℃。